



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**A ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR COLAGENA
POLIVINILPIRROLIDONA Y HEPARINA EN EL MUSCULO ISQUÉMICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN CIRUGÍA GENERAL

PRESENTA:

LEÓN ANGELES, DAVID DE

ASESOR: PADILLA SÁNCHEZ, LUIS

Ciudad Universitaria, México, Cd. Mx.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

[Handwritten signature]

DR LUIS PADILLA SANCHEZ
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN



[Handwritten signature]

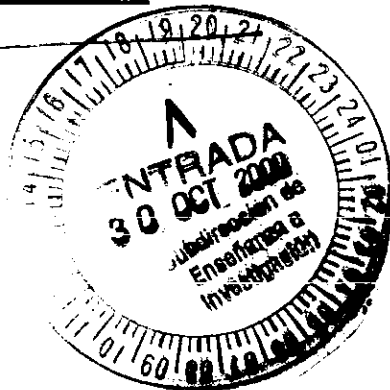
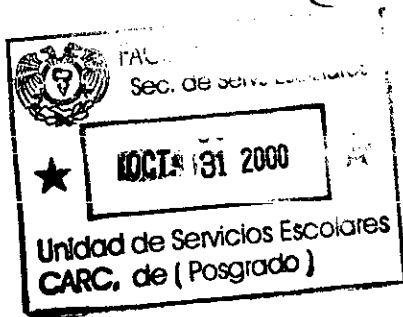
DR LUIS PADILLA SÁNCHEZ
ASESOR DE TESIS

[Handwritten signature]

DR EDUARDO FERNÁNDEZ DEL VILLAR
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

[Handwritten signature]

DR DAVID DE LEON ANGELES
AUTOR



[Handwritten number]

Angiogénesis inducida por colágena polivinilpirrolidona y heparina en el músculo isquémico

Acad. Dr. Luis Padilla S,* Dr. Siegfried Figueroa B,* Dr. David de León,* Dra. Irma Carrillo S,*
Dra. Ana Cristina King M,** Dr. Paul Schalch L,** Dr. Horacio Mollinedo R,**
Dr. Horacio Olguín J,** Dr. Fernando Viniegra R,** Dr. Gerardo Mercado L**

Resumen

Estudio de investigación experimental, prospectivo y comparativo, con el objeto de evaluar los efectos de la aplicación exógena de colágena tipo I, Polivinilpirrolidona (PVP) y heparina, en túneles musculares fibrocolágenos, en la extremidad isquémica de la rata, para inducir neovascularización o angiogénesis.

Se usó un modelo de isquemia en la extremidad posterior derecha de 40 ratas Wistar en dos tiempos. 1º Ligadura de la arteria iliaca común vía abdominal y colocación de una prótesis de silasticpoliéster en el músculo gracilis para la generación de un túnel fibrocolágeno. 2º Ocho semanas después, exposición del paquete vascular femoral, ligadura de esta arteria, localización y extracción de la prótesis, perforación y lavado del túnel fibrocolágeno y aplicación de sustancias.

En el grupo I se aplicó solución fisiológica, en el grupo II colágena tipo I con PVP, en el grupo III heparina sódica y grupo IV colágena tipo I con (PVP) y heparina sódica. Para la valoración se llevó a cabo angiografía de las extremidades tratadas, cuantificando el número de intersecciones en una superficie milimétrica de 50 x 50 mm. El mayor número de intersecciones se obtuvo en el grupo IV con una medida de 20.22 contra una media de 13.5 intersecciones en el grupo I (control con sol. fisiológica) = p de 0.14 mediante el análisis de varianza para comparar dos grupos (ANOVA).

El estudio demuestra mayor angiogénesis en el músculo isquémico de la rata, si se aplica colágena tipo I con (PVP) y heparina.

Palabras clave: angiogénesis, neovascularización, colágena tipo I, túnel fibrocolágeno.

Summary

Experimental, prospective and comparative research to evaluate the effects of exogenous application of the type I collagen, polyvinylpyrrolidone (PVP) and heparin into fibrocollagenous muscle tunnel of an ischemic lower limb of the rat, in search of new blood vessel formation or angiogenesis.

We used a two-stage ischemia model in the right hindlimb of 40 Wistar rats. 1º, by abdominal ligature of the common iliac artery and colocation of a silastic-polyester prosthesis into the gracilis muscle to create a fibrocollagen tunnel. 2º, weeks later, exposition and ligature of the femoral artery, localization and extraction of the prosthesis, perforating and washing the tunnel and application of different substances in four different groups.

We used saline solution for the pilot-group (I) where angiogenesis appeared as a response to ischemia; Group II type I collagen with (PVP); Group III heparin, and Group IV type I collagen with PVP and heparin. For the evaluation we practiced angiography of the treated limbs and quantified the number of intersection on a 50 x 50 mm milimetric surface. We obtained a p = 0.14 by comparing group IV (mean, 20.22 intersections) with group I (mean 13.5 intersections) using the analysis of variance (ANOVA) to compare two the groups.

It is proved that there is a larger neofomation of vessels in an ischemia model in the rat muscle if there is applied type I collagen with PVP and heparin in a muscular fibrocollagen tunnel.

Key words: Angiogenesis, Neovascularization, Type I collagen, Muscular fibrocollagen tunnel.

* Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM.

** Servicio de Cirugía Experimental Centro Médico Nacional «20 de Noviembre» Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado (ISSSTE).

Solicitud de sobretiros:

Dr. Luis Padilla Sánchez
Millet 83-205, Col. Del Valle
Del. Benito Juárez
C.P. 03100 México, D.F.
Tel.. 55-63-15-26

Recibido para publicación: 6 de octubre, 1998.

Aceptado para publicación: 10 de febrero, 1999.

Introducción

La enfermedad arterial obstructiva avanzada en las extremidades inferiores, que produce isquemia crónica con dolor, úlceras o gangrena, limita su tratamiento a la revascularización quirúrgica con derivaciones distales o terapia endovascular intervencionista.

Desafortunadamente en algunos pacientes no se puede aplicar el tratamiento por la severidad de la enfermedad, lo cual determina la amputación.

Los factores que participan en el mantenimiento de las condiciones homeostáticas vasculares incluyen la interacción

de las células del endotelio con los componentes de la matriz extracelular, así como la influencia de diversos mediadores solubles como el FTCS (Factor Transformante de Crecimiento Beta), β FGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos Beta), y VEGF (Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular).

Mediante la interacción de todos estos componentes, el sistema vascular y especialmente el endotelio puede guardar un estado basal de reposo, pero conserva la capacidad de responder frente a distintas condiciones de daño tisular e isquemia produciendo «angiogénesis».

La proliferación de células endoteliales y su ordenamiento tiene como requerimientos fundamentales la presencia de colágena tipo I y IV y proteoglicanos, particularmente el heparan sulfato el cual puede influir de manera importante su actividad biológica.

Tomando como base lo anteriormente expuesto se pretende, en este estudio de investigación experimental, inducir neovascularización o angiogénesis en la extremidad isquémica de la rata, utilizando un túnel fibrocolágeno producido mediante la introducción de una prótesis de silastic-poliéster, en la cual, después de un tiempo se aplica en su interior colágena tipo I con polivinilpirrolidona (PVP) y heparina, para que se formen células endoteliales en la cara externa e induzcan la formación de nuevos vasos sanguíneos y se reconecten a la circulación nativa, resolviendo la isquemia y/o evitando la amputación.

Nuestro grupo ha trabajado en el laboratorio desde 1977, buscando un microsustituto vascular de origen biológico o sintético, de 1 a 2 mm de diámetro, para resolver problemas de microcirugía clínica, cuando no se cuenta con venas autólogas⁽¹⁻⁴⁾.

Entre 1991 y 1992⁽⁵⁾, fue demostrado por varios grupos que las microprótesis de politetrafluoroetileno (PTFE) de pared delgada, de 1 a 2 mm de diámetro, implantadas a nivel de la aorta abdominal de la rata, reportaban 100% de permeabilidad, pero sólo 20% de neoendotelización.

Zilla en 1994⁽⁶⁾ aisló, cultivó y trasplantó células endoteliales (CE'S) autólogas, en prótesis de PTFE, de 70 cm de longitud y 6 mm de diámetro, colocándolas en derivación arterial, en 49 pacientes con isquemia severa. A 33 pacientes les colocó prótesis tratadas y dejó 16 como control sin CE'S. Obtuvo una permeabilidad de 84.7% para las prótesis trasplantadas con CE'S y de 55.4% para las no sembradas; a los tres años ($p < 0.023$). Las prótesis de PTFE, con trasplante de CE'S, fueron pretratadas en su interior con colágena tipo I y fibronectina.

En 1973, Sparks⁽⁷⁾, diseñó una técnica para preparar un tubo fibrocolágeno, con el implante de una prótesis silastic-poliéster, en el trayecto femoropoplíteo; y después de seis a ocho semanas extirpó el silastic, quedando un túnel liso y resistente por la malla, con el que se practicaba una anastomosis vascular, entre la prótesis y la arteria femoral proximal y la prótesis y la arteria poplíteo.

Tomando como base la colágena, reproducimos en nuestro laboratorio la técnica de Sparks, pero en ratas, pensando en explorar el trasplante de CE'S en este tipo de microsustitutos, manejando como hipótesis que las CE'S tendrían mayor adherencia que en el PTFE tratado con colágena y fibronectina.

En 1996⁽⁸⁾ publicamos nuestros resultados, donde obtuvimos 80% de permeabilidad, 25% de neoendotelización espontánea, 26.6% de aneurismas y 13% de calcificaciones. Sin embargo, el hallazgo de mayor importancia fue la presencia de vasos de neoformación o «angiogénesis» en la periferia del tubo, antes de su extirpación de la región dorsal de la rata.

Con este hallazgo, e interesados en el fenómeno de la angiogénesis, al revisar la bibliografía, encontramos que Li-Qun Pu y Symes⁽⁹⁾ demostraron, en conejos con isquemia severa de la extremidad inferior, que inyectando en el músculo el factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF), lograban crecimiento significativo de nuevos vasos sanguíneos y salvamento de la extremidad.

Baffour⁽¹⁰⁾, también en 1992 reportó «angiogénesis» y crecimiento de vasos colaterales en la extremidad isquémica del conejo, después de inyectar intramuscularmente el factor básico de crecimiento de fibroblastos recombinante (β FGF).

Jackson⁽¹¹⁾ demostró que la adición de 50 μ g/mL de heparina, al medio de cultivo de células endoteliales, genera la formación de tubos capilares *in vitro*, en respuesta a la colágena tipo I.

Por lo que formulamos la siguiente hipótesis:

Si en la extremidad isquémica de una rata, se forma un tubo muscular fibrocolágeno, con una red externa de capilares vasculares.

Entonces, las células endoteliales de la red, en presencia de colágena tipo I con (PVP) y heparina, formarían nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), que se conectaría a la circulación nativa, resolviendo la isquemia (Figura 1).

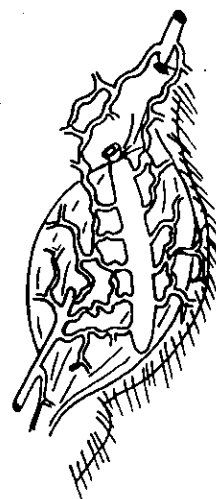


Figura 1. Inducción de angiogénesis para recuperar la circulación nativa.

Métodos

Material biológico

Se utilizaron 40 ratas Wistar machos de 250 g de peso.*

Modelo de desarrollo de isquemia de la extremidad posterior de la rata.

Previo al tratamiento con colágena con (PVP) y/o heparina, a todas las ratas, se les sometió a un procedimiento de isquemia en dos etapas:

Etapa I

Bajo anestesia general con éter y técnica limpia, pero no estéril, se abordó por vía abdominal, la arteria iliaca común derecha, disecando un trayecto de 3 a 4 mm de longitud, practicando ligadura y sección con Prolene 7 ceros (Figura 2-A)

Después de cerrar por planos el vientre, se practicó una incisión longitudinal en la extremidad posterior derecha, siguiendo el trayecto hacia la articulación de la rodilla, exponiendo el paquete vasculonervioso y el músculo gracilis, el cual se perforó con una pinza de punta de abajo hacia arriba, para guiar la tunelización de una prótesis de silastic-poliéster de 2 mm de diámetro y 30 mm de longitud; la cual se fija con Prolene 7 ceros (Figura 2-B).

Etapa II

Después de ocho semanas, en un segundo tiempo operativo, se expone el paquete vascular femoral, se aísla la arte-

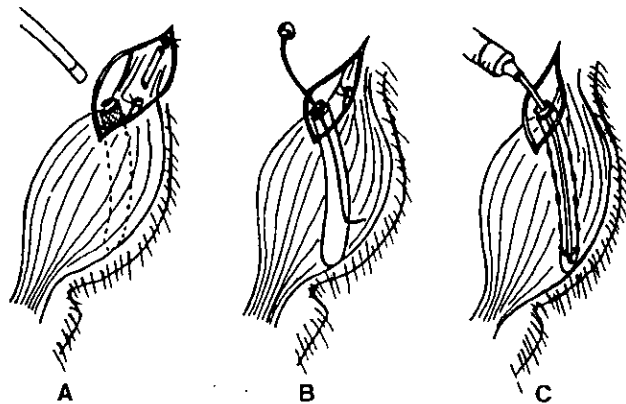


Figura 3. Ilustración de la Etapa II. Extracción del tubo de silastic, lavado y aplicación de las diferentes sustancias.

ria y se liga con sección en un trayecto de 4 mm de longitud; completando con esto el modelo de isquemia.

Se localiza y extrae el tubo de silastic, refiriendo la malla con tejido fibrocolágeno con tres puntos de Prolene 7 ceros, se lava con solución salina y se perfora el túnel de abajo hacia arriba con una aguja en 7 trayectorias diferentes. Se lava nuevamente con solución salina y se aplican respectivamente las dosis: solución salina, colágena tipo I con (PVP), heparina y colágena tipo I con (PVP) más heparina de acuerdo al grupo de estudio (Figuras 3 A-B-C).

Grupo	Tratamiento
Grupo I	Solución salina
Grupo II	Colágena tipo I con (PVP) (1.6 µg)
Grupo III	Heparina (200 U)
Grupo IV	Colágena tipo I con (PVP) (0.8 µg) y heparina (100 U.)

Evaluación

Las ratas que cumplieron los criterios de inclusión se evaluaron en diferentes tiempos entre 30 y 180 días, practicándoles arteriografía con cálculo de intersecciones para determinar la densidad capilar y técnica histológica de inmunoperoxidasa, para evaluar la fase proliferativa y de migración temprana de las células endoteliales.

Técnica de la arteriografía

Mediante un abordaje por vía abdominal, se identificó la aorta de la rata, la cual se ligó a un centímetro de su bifurcación, se canuló, y se inyectaron 3 mL de material de contraste, aplicándolo a razón de 1 mL/seg (70 KV a 25 mA), (mini X ray 903) (type B = 85. min X ray Inc) (Figuras 4 y 5).

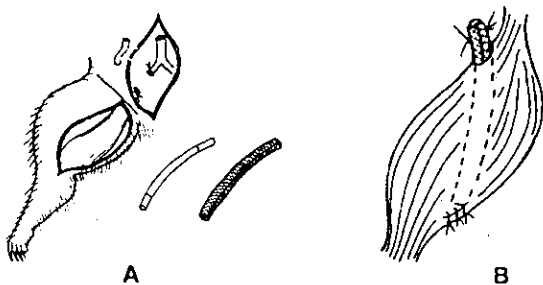


Figura 2. A.- Abordaje de la arteria iliaca común derecha. B.- Fijación de la prótesis de silastic-poliéster.

* Ley de Protección a los animales para el Distrito Federal, México Capítulo III. Art. 12-18 1988.

* Ley General de Salud. Investigación en Animales de Experimentación. Título Séptimo Art. 121-126 1992.



Figura 4. Técnica de arteriografía.

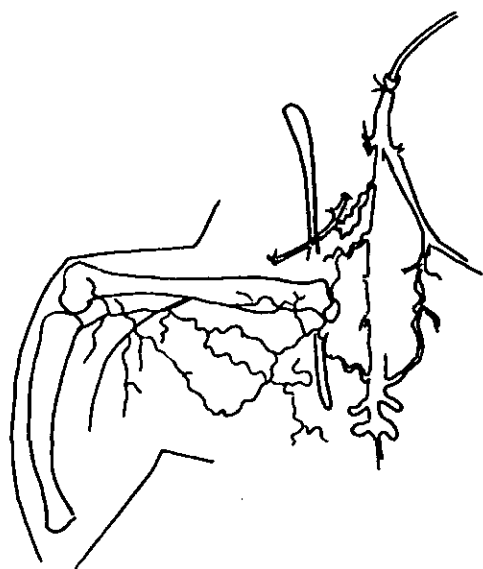


Figura 5. Técnica de arteriografía.

Técnica de toma de la biopsia

Inmediatamente después de la toma del tejido para analizar (músculo gracilis), se fijó con parafina y se realizaron cortes en laminillas, se desparafinaron mediante incubación a 56 °C, se bloquearon entonces con suero de cerdo y se les sometió a un tratamiento con peróxido de hidrógeno para evitar la reacción con peróxido endógeno. Después se inculó el anticuerpo monoclonal a la dilución óptima, se incubó a 37 °C durante una hora en cámara húmeda, se procedió al lavado cinco veces, utilizando buffers de fosfatos y se realizó la identificación con revelador 4-cloro-naptol, obteniéndose finalmente una coloración café en los sitios reconocidos con el anticuerpo.

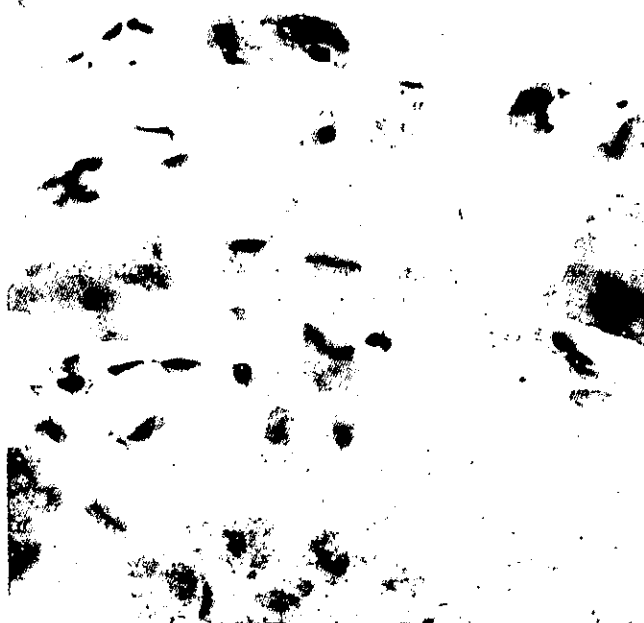


Figura 6. Vasos de neoformación. Células endoteliales marcadas con CD31.

Método estadístico

En el análisis estadístico, todos los datos fueron sometidos al método de desviación estándar, en base a las medias de intersección para cada categoría de grupo, además fue utilizado el análisis de varianza «ANOVA» para determinar los resultados por grupo. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar el número de intersecciones en los diferentes grupos. Todas las pruebas fueron realizadas en el epi-info- software.

Resultados

De las 40 ratas, sólo 27 cumplieron con los criterios de inclusión. La inspección visual de las arteriografías demostró aumento de la trama vascular y la perfusión en el miembro posterior derecho de las ratas tratadas con colágena tipo I con (PVP) y colágena tipo I con (PVP)-heparina, aunque no hubo una significancia estadística relevante en los análisis de varianza, debido al tamaño pequeño de la muestra, sí fue demostrativa.

Comparación del grupo de colágena en el grupo control

El grupo control con solución salina fue representado por 4 ratas con 5 a 20 intersecciones con una media de 13.5 y el grupo de colágena tipo I con (PVP) representado por 9 ratas con una media de intersecciones de 17.

Obtuvimos una varianza (Bartlett) con valor $p = 0.201913$, con la prueba de Kruskal-Wallis (chi cuadrada) para dos grupos con un valor de $p = 1.000000$, y ANOVA con una $p = .641991$.

Comparación del grupo de heparina con el grupo control

El grupo de heparina fue representado por 5 ratas con 3 a 4 intersecciones.

Obtuvimos una varianza con valor $p = 0.423015$, con la prueba de Kruskal-Wallis $p = 1.000000$ ANOVA $p = 0.862167$.

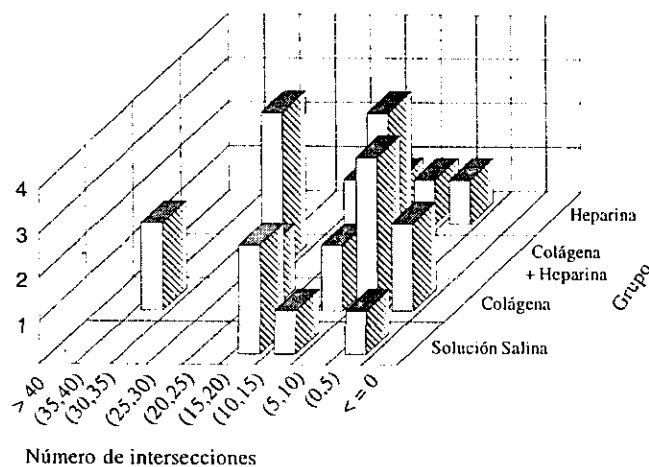
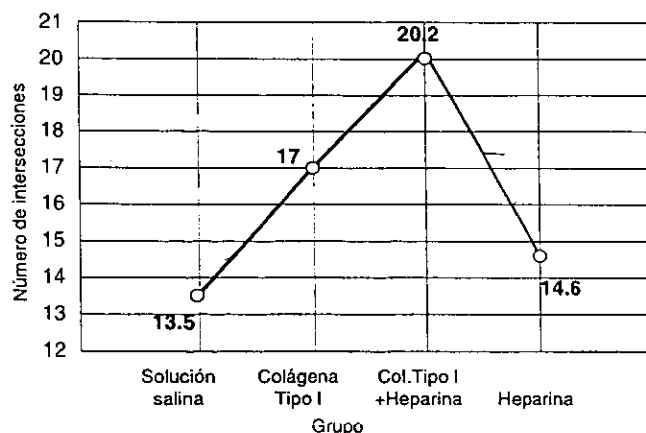


Figura 7. Angiogenesis en el músculo isquémico de la rata. distribución del número de intersecciones según grupo de estudio.



Análisis de varianza: $F(3, 23) = 0.52$; $p < 0.67$

Figura 8. Comparación de respuestas medias de angiogenesis.

Comparación del grupo colágena tipo I y heparina con el grupo control

El grupo con colágena tipo I con (PVP) y heparina fue representado por 9 ratas con una media de intersecciones de 20.22, obteniendo un ANOVA con valor de $p = 0.144099$, varianza de Bartlett con un valor $p = 0.833096$, la prueba de Kruskal-Wallis con un valor $p = 0.188444$

Inmunoperoxidasa

Usando esta técnica, se observó microscópicamente en el tejido obtenido de los 4 grupos de ratas, la presencia de células endoteliales de neoformación, valorando la inducción y angiogenesis resultante del túnel y los activadores de la vasculatura usados como la heparina, colágena y la combinación de ambos, identificándose un mayor grado de neovascularización en el último grupo (Figura 6).

En las figuras 7 y 8 y en el cuadro I se ilustran los resultados globales.

Discusión

Angiogenesis es la formación de nuevas redes de vasos capilares por brotes, que dependen de la activación, migración y proliferación de células endoteliales, en espacios avasculares por estímulo de factores de crecimiento y la hipoxia⁽¹⁶⁾.

Los factores de crecimiento son polipéptidos biológicos con actividad y funciones similares a las de las hormonas. Sus funciones se relacionan principalmente con el control de la proliferación y la diferenciación de las células. No son consideradas hormonas, porque no las producen órganos especializados, sino gran variedad de tejidos y se transportan por difusión, no por el torrente circulatorio⁽¹⁷⁾.

La presencia no esperada de vasos de neoformación en la cara externa de tubos fibrocolágenos, que utilizamos como microsustitutos vasculares en la rata, fue lo que despertó nuestro interés en el fenómeno de «angiogenesis» y el papel de la célula endotelial⁽⁸⁾.

Li-Qun, Symes, Baffour, Bauters, Takeshita e Isner^(9,10,12,13,15) demostraron la factibilidad para inducir angiogenesis en extremidades de conejo con isquemia severa; al suministrarles diversos factores de crecimiento, (citoquinas), con capacidad de estimular a la célula endotelial (βFGF, ECGF, VEGF).

Jackson⁽¹¹⁾ y Hughes⁽¹⁴⁾, lograron en el laboratorio, reproducir el fenómeno de angiogenesis, pero *in vitro*, utilizando colágena y heparina en los cultivos de células endoteliales, las cuales se ordenan formando tubos capilares.

En este estudio experimental observamos que, aplicando colágena tipo I con (PVP) y heparina en túneles musculares fibrocolágenos, en la extremidad isquémica de la rata, se induce la formación de nuevos vasos sanguíneos; pues el grupo I al que aplicamos solución salina sólo presentó una me-

Cuadro I.

Grupo	N	Media	D.E.	Intervalo de confianza para la media (95%) del número de intersecciones		
				7.0	14.0	21.0
Solución salina	4	13.50	6.56	(----- * -----)		
Colágena Tipo I	9	17.00	13.71		(----- * -----)	
Heparina	5	14.60	10.62	(----- * -----)		
Colágena Tipo I + Hep.	9	20.22	7.31		(----- * -----)	
D.E. Ponderada = 10.45						
				----- + ----- + -----		
				7.0	14.0	21.0

día de 13.5 de intersecciones, contra 26 del grupo IV, de colágena con (PVP)-heparina.

Podemos interpretar que estos resultados, reproducen en el músculo isquémico de la rata, las mismas condiciones que logran la formación de tubos capilares en el cultivo de células endoteliales que reportaron Jackson⁽¹¹⁾ y Hughes⁽¹⁴⁾ (isquemia, heparina, colágena y células endoteliales locales).

Baumgartner e Isner⁽¹⁸⁾ publicaron los resultados de terapia genética aplicada a 10 pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores, a los que se les inyectó intramuscularmente un plásmido DNA de factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF, logrando angiogénesis con nuevos vasos colaterales en 7 de los 10 enfermos, evitando la amputación.

Hamdan⁽¹⁹⁾ demostró que el VEGF es una glicoproteína producida por muchos tipos de células en cultivo e *in vivo*, incluyendo la célula endotelial, y observando que después de un puente con vena autóloga en el perro, la expresión del VEGF se incrementa por hipoxia.

Goldsmith⁽²⁰⁾ en 1984, al observar el desarrollo de numerosas conexiones neovasculares entre la superficie del cerebro isquémico y el epiplón interpuesto quirúrgicamente; inició la búsqueda del factor que causa esta respuesta, llegando a aislar un «factor lipídico angiogénico» que ensayó en gatos con isquemia de extremidades posteriores, demostrando que la inyección intramuscular incrementó la perfusión vascular en forma significativa⁽²¹⁾.

Zhang⁽²²⁾ en 1997, demuestra que el epiplón secreta gran cantidad del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), lo que explica su capacidad de angiogénesis.

Nuestros hallazgos justifican continuar con una segunda etapa en perros, usando el mismo modelo experimental con colágena tipo I con (PVP) y heparina; pero agregando el trasplante de células endoteliales y la aplicación del «Factor lipídico angiogénico» derivados del epiplón, para tener

acción directa del VEGF y esperar una angiogénesis más intensa.

En conclusión:

1. El modelo experimental, sí logra la formación de un túnel muscular-fibrocolágeno.
2. Aplicando solución salina, se forman menos vasos sanguíneos (13.5 intersecciones).
3. Aplicando colágena tipo I con (PVP) y heparina se forman más vasos sanguíneos (20.2 intersecciones).
4. Se justifica continuar con la segunda etapa de este estudio, en donde a perros, con el mismo modelo de isquemia, se les aplicará en el túnel muscular fibrocolágeno, un trasplante de células endoteliales con colágena tipo I con (PVP) y heparina.

Agradecimientos

Al Dr. Benjamín León, por las angiografías llevadas a cabo en todos los animales de prueba, a la Dra. Karina Morales por los estudios de inmunoensayo con peroxidasa, y al Matemático Jorge Galicia, por el cálculo estadístico de los resultados.

Referencias

1. Padilla SL, Valle SA, Sánchez CR. Trasplante en ratas de arterias pretratadas con enzimas preteolíticas. Arch Inst Cardiol Mex 1983; 53: 91-98.
2. Padilla SL, Sastre ON, Chousleb KA, Di Silvio LM, Contreras M, Manzano SB, Reyes SCR. Polytetrafluoroethylene microprosthesis in the venous system of the rat. J Reconstr Microsurg 1987; 3: 159-163.
3. Padilla SL, Valle GA, Carrillo LH, Di Silvio LM, Viniestra RF, Contreras MRF, Sánchez CR. Polytetrafluoroethylene microprosthesis in the arterial system of the rat. J Reconstr Microsurg 1987; 4: 33-37.
4. Padilla SL, Chousleb KA, Di Silvio LM, Viniestra RF, Shultze RA, Sánchez CR, Ornelas L, Rocha HG, Galicia J. Injertos vasculares biológicos para microcirugía. Rev Fac Med UNAM 1990; 33: 11-18.

Angiogénesis inducida por colágena polivinilpirrolidona y heparina en el músculo isquémico

5. Padilla SL, Chousleb KA, Rocha HG, Di Silvio LM, Viniegra RF, Vázquez CJ, Chávez V, Rodríguez TJ, Aguilar MC, Pérez S. Microprótesis de politetrafluoroetileno de pared delgada. *Rev Mex Angiol* 1991; 19: 14-19.
6. Zilla PL, Deutschm, Meinharta J, Fischelein T et al. Clinical *in vitro* endothelialization of femoropopliteal bypass grafts: An actuarial follow up over three years. *J Vasc Surg* 1994; 19: 549-48.
7. Sparks CHH. Silicone mandril method for growing reinforced autogenous femoro-popliteal artery grafts *in situ*. *Ann Surg* 1973; 177: 293-300.
8. Padilla SL, Carrillo Soto UA, García GMV, Valdés GR et al. Angiogénesis inducida por túneles fibrocolágenos. *Rev Cir Gral* 1996; 18: 123-128.
9. Li-Qun Pu, Arekat Z, Brassard R, Symes FA et al. Demonstration of significantly enhanced neovascularization by angiogenic stimulation in the ischemic limb. *Surg Forum* 1992; 43: 368-370.
10. Baffour R, Berman J, Garb JL et al. Enhanced angiogenesis and growth factor of collaterals by *in vivo* administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia. *J Vasc Surg* 1992; 16: 181-191.
11. Jackson Ch, Giles Y, Nethery A, Schrieber L et al. Sulfated polysaccharides are required for collagen-induced vascular tube formation. *Exp Cell Res* 1994; 215: 294-302.
12. Bauters Ch, Asahara T, Symes JF, Isner JM et al. Site-specific therapeutic angiogenesis systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vas Surg* 1995; 21: 314-25.
13. Takeshita S, Bauters Ch, Symes JF, Isner JM et al. Time course of increased cellular proliferation in collateral arteries after administration of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of lower limb vascular insufficiency. *Am J Pathol* 1995; 147: 1649-1660.
14. Hughes SE. Functional characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304: use in an *in vitro* model of angiogenesis. *Exp Cell Res* 1996; 225: 171-185.
15. Isner JM, Pieczek A, Symes JF et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of ph VEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996; 348: 370-3.
16. Folkman T. *Angiogenic Factors Science* 1987; 235: 442-447.
17. Verdugo DL. Factores de Crecimiento. *Rev Fac Med UNAM* 1994; 37: 184-189.
18. Baumgarther I, Pieczek A, Isner JM. Constitutive expression of phVEGF 165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97: 1114-1123.
19. Hamdan AD, Contreras M, Logerfo FM. Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) Expression in canine peripheral vein bypass grafts. *J Vasc Surg* 1997; 26: 79-86.
20. Goldsmith HG, Griffith AL, Kupferman A et al. Lipid Angiogenic Factor from omentum. *JAMA* 1984; 252: 2034-2036.
21. Goldsmith HG, Griffith AL, Catsimpoilas N. Increased vascular perfusion after administration of an omental lipid fraction. *Surg Gynecol Obstet.* 1986; 162: 579-583.
22. Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA et al. Vascular Edothelial growth factor (VEGF) is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum mediated angiogenesis. *J Surg Res* 1997; 67: 147-154.